

專利名稱: New hypotensive fraction in culture broth of Monascus sp. mould - absorbed on acidic cation exchange region. washing and eluting by pyridine acetate buffer

專利權人名稱: (GNZE) GUNZE KK

hypotensive 之 回復

| 專利號 | 型別 | 專利公告/公開日 | 週別語言 | 頁數 | 國際專利分類 |
|-------------|--------|----------|------|-----|--------|
| JP62298598A | 871225 | 8806 | 9 | " " | |

優先權項 (國別 申請號 日期): JP 0141082 (860616)

專利申請相關細目:

| 日期 | 說明 | 申請號 | 專利號 | 型別 |
|--------|----|--------------|-----|-------------|
| 860616 | | 86JP-0141082 | | Application |

國際專利分類: A61K035/70; C07G017/00; C12P001/02; C12R001/64; C12P001/02; C12R001/645;

Derwent 分類: B04; D16;

Derwent CPI 碼: B04-B02B2; B12-F05; D05-C;

專利摘要: (JP62298598A) A new hypotensive fraction is collected and fractionated from culture broth of Monascus sp. mould. It's physicochemical properties are (a) column chromatography when it is dissolved in 28% AcOH aq. soln., adsorbed on strong acidic cation exchange region column preliminarily equilibrated by 0.2M pyridine-acetate buffer of pH 3.1, and after washing by 0.2M-pyridine-acetate buffer of pH 3.1 (2 fold vol. of the column) at 55 deg.C, 50 ml/hr. flow rate, eluted by 0.4M pyridine-acetate buffer of pH 4.6 under the same conditions, it is eluted at the corresp. position of that of standard neutral amino acid, (b) solubility soluble in H₂O, MeOH, EtOH, acetone, insol. in n-BuOH, EtOAc, hexane, benzene, CHCl₃, (c) nature and outlook, highly viscous liq., dark brown, (d) m.w.; mixt. of m.w. below 3000 (gel filtration) and (e) colour reaction positive (ninhydrin, Folin). USE/ADVANTAGE - It has a strong hypotensive effect (by SHR), it's daily dose is 0.025-5000 mg. It is very safe and nontoxic. LD(50) is more than 5 g/kg. (p.o.) by rats.10/0

專利名稱主題語: NEW HYPOTENSIVE FRACTION CULTURE BROTH MONASCUS SPECIES MOULD ABSORB ACIDIC CATION EXCHANGE REGION WASHING ELUTION PYRIDINE ACETATE BUFFER

化學類輔助登記號: C88-017841

僅供內部使用, 著作權所有

(C)CopyRight 1996-1998 Derwent Information Limited

Derwent 基本專利登記號: 88-011694

X 專利名稱: L-carnitine, used for cardiopathy - is prepd. by treating crotono:betaine with microorganism having power to convert crotono:betaine into L-carnitine

專利權人名稱: (BIOL-)BIOL KK ; (CHUO-)CHUOU CASEIHIN KK

| 專利號 | 型別 | 專利公告/公開日 | 週別語言 | 頁數 | 國際專利分類 |
|-------------|--------|----------|------|-----|--------|
| JP62275689A | 871130 | 8802 | 7 | " " | |

優先權項 (國別 申請號 日期): JP 0275181 (851209)

EXPRESS MAIL NO.:

EV327549117US

1002年2月0日

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-298598

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)12月25日

C 07 G 17/00
C 12 P 1/02
// A 61 K 35/70
(C 12 P 1/02
C 12 R 1:645)

ABU

6692-4H
6760-4B
8615-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 モナスカス属糸状菌培養物の新規降圧画分

⑯ 特 願 昭61-141082

⑰ 出 願 昭61(1986)6月16日

| | | | |
|---------|----------|---------------|----------|
| ⑱ 発 明 者 | 梶 井 庄 一 | 綾部市井倉新町石風呂1番地 | グンゼ株式会社内 |
| ⑲ 発 明 者 | 田 邊 伸 和 | 綾部市井倉新町石風呂1番地 | グンゼ株式会社内 |
| ⑳ 発 明 者 | 吉 田 歩 | 綾部市井倉新町石風呂1番地 | グンゼ株式会社内 |
| ㉑ 出 願 人 | グンゼ株式会社 | 綾部市青野町膳所1番地 | |
| ㉒ 代 理 人 | 弁理士 青山 葆 | 外2名 | |

明 細 書

1. 発明の名称

モナスカス属糸状菌培養物の新規降圧画分

2. 特許請求の範囲

(1) モナスカス(Monascus)属糸状菌培養物から採取、分画された、下記の理化学的性質を有する新規降圧画分。

(a) カラムクロマトグラフィー

2.8%酢酸水溶液に溶解し、pH 3.1の0.2 Mピリジン-酢酸緩衝液で平衡させた強酸性陽イオン交換樹脂カラムに吸着させ、55℃、流速50 ml/時に、カラムの2倍容量分のpH 3.1の0.2 Mピリジン-酢酸緩衝液を流して洗浄後、同じ条件で、pH 4.6の0.4 Mピリジン-酢酸緩衝液で溶出すると、中性アミノ酸標品の溶出位置に対応する位置に溶出する。

(b) 溶解性

水、メタノール、エタノール、アセトンに可溶、n-ブタノール、酢酸エチル、ヘキサン、ベンゼン、クロロホルムに不溶。

(c) 性状および外観

高粘度の液体、こげ茶色。

(d) 分子量

ゲル濾過法による分子量3000以下の物質の混合体。

(e) 呈色反応

ニンヒドリン反応およびフォーリン反応陽性。

(2) 該モナスカス属の糸状菌が、モナスカス・アンカ(Monascus anka)、モナスカス・ピロウサス(Monascus pilosus)、モナスカス・ルーバー(Monascus ruber)、モナスカス・プープレウス(Monascus pupureus)、モナスカス・メージャー(Monascus major)、モナスカス・ビスポラス(Monascus bisporus)、モナスカス・ルプロバクタクタス(Monascus rubropunctatus)、モナスカス・コウリヤン(Monascus kaoliang)、モナスカス・アルビダス(Monascus albidus)、モナスカス・アラネオサス(Monascus araneosus)、モナスカス・フリジノサス(Monascus fuliginosus)、モナスカス・パキシイ(Monascus paxii)、

モナスカス・パビジールス(Monascus pubigerus)、モナスカス・ルビジノース(Monascus rubiginosus)、モナスカス・セロルビセンス(Monascus serorubescens)、モナスカス・ビトレウス(Monascus vitreus)およびモナスカス・アルバス(Monascus albus)ならびにこれらの変種および変異種から選ばれる前記第(1)項の画分。

(3)該培養物が紅麹である前記第(1)項の画分。

3. 発明の詳細な説明

発明の分野

本発明は、モナスカス(Monascus)属糸状菌培養物の新規降圧画分に関する。本発明の新規降圧画分は優れた血圧降下作用を有し、かつ、食用にも適しており、高血圧改善用の医薬や食品の分野で有用である。

発明の背景

モナスカス属の糸状菌は、いわゆる紅麹と称される醸造麹類製用の糸状菌として知られている。

オン交換樹脂カラム、例えば、アンバーライトC C 120カラムに吸着させ、55℃、流速50ml/時にて、カラムの2倍容量分のpH3.1の0.2Mピリジン-酢酸緩衝液を流して洗浄後、同じ条件で、pH4.6の0.4Mピリジン-酢酸緩衝液で溶出すると、中性アミノ酸標品の溶出位置に対応するグリシンとγ-アミノ酪酸の中間の位置に溶出する。

(b)溶解性

水、メタノール、エタノール、アセトンに可溶、n-ブタノール、酢酸エチル、ヘキサン、ベンゼン、クロロホルムに不溶。

(c)性状および外観

高粘度の液体、こげ茶色。

(d)分子量

ゲル濾過法による分子量3,000以下の物質の混合体。

(e)呈色反応

ニンヒドリン反応およびフォーリン反応陽性。

なお、逆相カラム、たとえば、μ-Bondapak

本発明者らは、種々の麹の生理活性を検討する間にある種の麹、とりわけこの紅麹に優れた血圧降下作用が存在し、高血圧状態の改善に有用であることを見出し、すでに特許出願した(特願昭60-29131号)。

その後、さらに研究を重ねた結果、紅麹をはじめ、モナスカス属の糸状菌の培養物をエタノールや水などの溶剤で抽出した後、イオン交換クロマトグラフィーで分画して得られる特定の画分に、培養物中の血圧降下作用を有する有効成分がほとんど全て濃縮され、微量でも優れた高血圧改善効果を発揮することを見出し、本発明を完成するにいたった。

発明の開示

本発明は、モナスカス属糸状菌培養物から採取、分画された、下記の理化学的性質を有する新規降圧画分を提供するものである。

(a)カラムクロマトグラフィー

28%酢酸水溶液に溶解し、pH3.1の0.2Mピリジン-酢酸緩衝液で平衡させた強酸性陽イ

C-18による該画分の高速液体クロマトグラフィーはアセチルコリンの存在を示す。

本発明の降圧画分の調製に用いるモナスカス属の糸状菌としては、当業者が入手できる公知のものでよく、例えば、モナスカス・アンカ(Monascus anka)、モナスカス・ピロウサス(Monascus pilosus)、モナスカス・ルーバー(Monascus ruber)、モナスカス・プープレウス(Monascus pupureus)、モナスカス・メジャー(Monascus major)、モナスカス・ビスポラス(Monascus bisporus)、モナスカス・ルプロパンクタス(Monascus rubropunctatus)、モナスカス・コウリヤン(Monascus kaoliang)、モナスカス・アルビダス(Monascus albidus)、モナスカス・アラネオサス(Monascus araneosus)、モナスカス・フリジノサス(Monascus fuliginosus)、モナスカス・パキシイ(Monascus paxi)、モナスカス・パビジールス(Monascus pubigerus)、モナスカス・ルビシセノース(Monascus rubiginosus)、モナスカス・セロルビセンス

(*Monascus serorubescens*)、モナスカス・ビトレウス(*Monascus vitreus*)およびモナスカス・アルバス(*Monascus albus*)ならびにこれらの変種および変異種から選ばれる糸状菌が挙げられ、これらは単独でも、2種以上併用してもよい。とりわけ、血圧降下作用の強い画分が得られるところから、モナスカス・ピロウサス、モナスカス・アンガ、これらの変種および変異種が好ましい。

用いるモナスカス属糸状菌培養物は該糸状菌を公知の方法に従って培養した固体または液体培養物いずれでもよく、代表的なものとしては、精白米、玄米、麦、粟、コウリヤン、ソバ、トウモロコシ、大豆、小豆などの各種の穀類や、それらの餅、フスマ、胚芽、モミガラ等のでん粉質原料の1種または2種以上を用い、公知の固体培養法(バラ培養法、餅培養法)または液状培養法に従って培養した、いわゆる紅麹が挙げられる。また、モナスカス属糸状菌の増殖に必要な各種の炭素源、窒素源、無機質、ビタミン等を用いて調製した液体培地を用いて培養した培養液も使用できる。一般に、2

のごとき、理化学的性質を有する降圧画分が得られる。この画分は、所望により、凍結乾燥等の処理を施してもよく、それらも、本発明範囲のものである。

本発明の新規降圧画分はそのままの形態で高血圧改善剤として用いることができ、また、賦形剤や担体などと組み合わせて各種の医薬品の形態、例えば、カプセル剤、粉末、顆粒、ペースト、注射剤などの形態をとることもできる。また紅麹自体は従来から中国などで食品の製造原料として用いられてきたものであり、本発明の画分も各種の食品に添加して食品添加物の形態とすることもできる。

本発明の新規降圧画分は、ラットにおけるLD₅₀値が、5g/kg以上(経口)であることからわかるように無毒性または安全であり、従って摂取量ないし投与量は改善すべき高血圧状態に応じて広範囲に変化させることができる。一般に、穏やかな高血圧状態の改善が達成されるのに必要な摂取量ないし経口投与すべき量は、紅麹の場合は乾燥物

0~40℃で、2~14日間糸状菌を好氣的に培養することにより、血圧降下作用の強い画分を含む培養物が得られる。

培養物からの採取は、例えば、メタノール、エタノール、アセトン、水等の溶媒による抽出、これらの溶媒への溶解、n-ブタノール、酢酸エチル、ヘキサン、ベンゼン、クロロホルム等の溶媒による不純物の抽出除去などの操作を適宜組み合わせで行うことができ、液体培養物の場合は、予め、遠心分離等により菌体を除去しておいてもよい。これらの操作は、一般に、室温で行うことができ、溶媒は常法により、減圧下にて除去することができる。

所望の画分の分離は、採取した物質を、例えば、28%酢酸水溶液に溶解し、強酸性陽イオン交換樹脂、例えば、ダウエックス50W-X8、アンバーライトCG-120などの樹脂のカラムクロマトグラフィーに付し、ビリジーン-酢酸緩衝液で溶出することにより行うことができる。

溶出液から常法により溶媒を除去すると、前記

として1日当たり1~200gであるのに対し、本発明の画分の場合は1日当たり、0.025~5.000mgと、極めて微量でよい。

発明の効果

高血圧自然発症ラット(以下、SHRと称する。)における、後記実施例1で調製した紅麹および本発明によるその降圧画分の血圧に及ぼす影響を試験した。

また、対照として、紅麹の原料とした精白米を同様な条件で浸漬、水切りし、蒸釜滅菌後、40℃で水分含量12%に乾燥して得た蒸釜米を用いた。

紅麹および対照の蒸釜米の栄養成分分析の結果は第1表のとおりである。

第1表

| 成 分 | 紅 麹 | | 蒸 煮 米 | |
|------|------|------|-------|------|
| | 生 | 乾燥 | 生 | 乾燥 |
| 水 分 | 44.2 | 11.2 | 65.0 | 11.8 |
| 蛋白質 | 5.5 | 8.8 | 2.6 | 6.6 |
| 脂 肪 | 1.5 | 2.4 | 0.5 | 1.3 |
| 炭水化物 | 48.7 | 77.5 | 31.8 | 80.1 |
| 灰 分 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.3 |

(%)

試験は1群8頭の雄のSHR(平均体重351g)を用いて行った。半合成飼料に紅麹を10%加えた飼料、本発明画分を紅麹10%に相当する0.00025%加えた飼料、および対照として蒸煮米を10%添加した飼料を調製し、3群のラットに対して、3週間、蒸留水と共に自由摂取させて飼育した。週1回、ラット尾動脈圧測定装置PS-100で血圧を測定し、血圧変化を追跡した。

各飼料の組成を第2表に、また、血圧測定結果を添付の第1図に示す。

だが、通常は3~4日で対照群のレベルに戻るべきところ、さらに1週間後でも対照群より低い血圧を示しており、紅麹および本発明画分の血圧降下作用に強い持続性が認められる。

なお、試験期間中、ラットの体重変化や飼料摂取量は各群において差異は認められなかった。また、紅麹および本発明画分のミネラル代謝に与える影響を調べるために、飼料摂取3週間後、ラットをメタボリックケージに2日間入れ、ミネラルの摂取量、糞および尿中のミネラルの排泄量、排泄率を求めたが、各群間に大きな差は認められなかった。

第1図に示す如く、紅麹投与群と本発明画分投与群はほぼ同様の血圧降下状態を示しており、投与量等からみて、本発明画分には紅麹中の血圧降下作用を有する有効成分がほとんど全部回収されていることが判明した。これより紅麹を本発明の画分とすることにより極めて微量で紅麹同様の優れた高血圧改善効果が期待できることがわかる。また、作用機序については不明であるが、アルギ

各飼料の組成を第2表に、また、血圧測定結果を添付の第1図に示す。

第2表

| 成 分 | 対照飼料 | 本発明画分飼料 | 紅麹飼料 |
|---------|-------|---------|-------|
| カゼイン | 22 | 22 | 22 |
| ラード | 10 | 10 | 10 |
| ミネラル混合物 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| ビタミン混合物 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| 食 塩 | 1 | 1 | 1 |
| 塩化コリン | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| セルロース | 3 | 3 | 3 |
| 紅麹エキス | — | 0.00025 | — |
| 紅麹(乾燥物) | — | — | 10 |
| ショ糖 | 59.15 | 59.15 | 49.15 |

(%)

第1図に示す如く、紅麹または本発明画分を加えた飼料を与えた群ではいずれも著しい血圧降下作用が認められる。また、3週間後、各飼料の投与をやめ、市販の固形飼料(CE-2)に切り替え

ン酸などの食物繊維が有している消化管内でのイオン交換反応に伴うミネラル代謝の変化とは異なった別の作用機序によるものと考えられる。

以上のように本発明の画分は高血圧状態を改善する優れた作用を有し、医薬品あるいは食品の分野で非常に有用である。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、これらに限定されるものではない。

実施例1

精白米を12時間水に浸漬した後、1時間水切りし、120℃にて30分間蒸煮滅菌して蒸米を得た。これにモナスカス・ピロウサスIFO 4520を接種し、好氣的に30℃で8日間静置培養した後、送風乾燥機を用いて50℃で乾燥して水分率12%の紅麹を得た。

この紅麹10kgを室温で1週間、4倍量のエタノールに浸漬した後、エタノール層と残渣を分別し、残渣は同様にしてさらに2回、エタノール抽出を行った。全エタノール抽出液を減圧下、50

で濃縮乾燥してエタノール抽出物141.2gを得た。

このエタノール抽出物141.2gを水2ℓおよび酢酸エチル500ℓに溶解し、攪拌し、放置した後、水層と酢酸エチル層とを分離した。該水層を酢酸エチル500ℓで4回、撚いてn-ブタノール500ℓで5回抽出して不純物を除去した。次いで該水層を減圧下で濃縮して水抽出物71.4gを得た。

該水抽出物71.4gを28%酢酸水溶液250ℓに溶解し、室温においてpH3.1の0.2Mピリジン-酢酸緩衝液で平衡化したダウエクセス50W-X8カラム(内径4.7cm×高さ28.5cm、500ℓ、50~100メッシュ、ピリジン型)に吸着させ、pH3.1の0.2Mピリジン-酢酸緩衝液2.5ℓで未吸着物を溶出して洗浄した後、pH4.9の0.1Mピリジン-酢酸緩衝液2.5ℓを用いて流速100ℓ/hrで溶出した。溶出液を濃縮し、凍結乾燥して活性画分6.1gを得た。該活性画分6.1gを28%酢酸水溶液に溶解し、5

する。これに圧力計に接続した動脈カニューレを挿入した。この状態のSHRに、生理的食塩水に溶解し、pH7.0に調整した各フラクションの乾燥物を250μg/kg SHR体重で静脈注射し、血圧変化を観察した。血圧低下率は静脈注射直前の血圧に対する注射後の血圧の減少率(%)で示した。

第2図に示すごとく、フラクションNo.12~32に著しい血圧降下作用が認められる。このフラクションNo.12~32は、図中、矢印で示すグリシン標品とγ-アミノ酪酸標品の溶出位置の中間に位置し、中性アミノ酸標品の溶出位置に対応する。これらを合した画分が本発明の降圧画分である。

また、これらのフラクションNo.12~32は、つぎの方法によるニンヒドリン反応およびフォーリン反応に対して陽性を示した。

ニンヒドリン呈色反応

溶出液0.05ℓを水0.95ℓと混合し、これにA液0.2ℓ、B液1ℓおよびC液5ℓを加え

5℃においてpH3.1の0.2Mピリジン-酢酸緩衝液で平衡化したアンバーライトCG-120タイプⅢカラム(内径0.9cm×高さ156cm、100ℓ、400~600メッシュ)に吸着させ、pH3.1の0.2Mピリジン-酢酸緩衝液200ℓで洗浄した後、pH4.9の0.4Mピリジン-酢酸緩衝液を用いて流速50ℓ/hrで溶出した。中性アミノ酸の溶出位置に相当する溶出物を集めて、減圧濃縮し、凍結乾燥して、前記の理化学的性質を有する所望の降圧画分230mgを得た。

この降圧画分はこげ茶色の外観を呈し、性状は高粘度の液体である。また、該画分5mgを水100ℓに溶解したときのpHは4.7である。

このアンバーライトCG-120タイプⅢカラムからの溶出パターンを添付の第2図に示す。第2図は、溶出液を5ℓずつのフラクションに分けて捕集し、各フラクションのSHRにおける血圧降下作用をつぎのとおり検定し、フラクションNo.に対してプロットしたグラフである。

SHRをウレタンで麻酔し、右側頸動脈を露出

して露出する。ついで、100℃で15分間加熱する。希釈液3~5ℓを加え、570nmにおける吸光度を測定する。

A液：ニンヒドリン溶液

ニンヒドリン2.5gをメチルセロソルブ50ℓに溶解。

B液：シアン化カリウム溶液

0.01mol/lシアン化カリウム水溶液5ℓをメチルセロソルブ245ℓと混合。

C液：クエン酸緩衝液

クエン酸一水塩21gを蒸留水200ℓに溶解。1N水酸化ナトリウム水溶液200ℓを加えた後、さらに蒸留水を加えて全量を500ℓとする。

希釈液：60%エタノール

フォーリン呈色反応

溶出液20μℓに蒸留水230μℓおよびC液1.25ℓを加えて攪拌する。約10分間放置した後、D液125μℓを加えて攪拌し、30分間放置し、750nmにおける吸光度を測定する。

A液: 2%炭酸ナトリウム水溶液/0.1N水酸化ナトリウム水溶液

B液: 0.5%硫酸銅五水塩/0.1%酒石酸ナトリウム水溶液

C液: A液50mlおよびB液1mlを混合。

D液: 50%フェノール試液

なお、第2図のA-2ピークに相当するフラクションを集め、高速液体クロマトグラフィー(カラム: μ -Bondapak C-18, 3.9×300 mm; 溶出液: アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸水溶液(3:97); 流速: 1.0 ml/分; 検出: RI)に付したところ、アセチルコリンの存在が確認された。添付の第3図にそのクロマトグラムを示す。アセチルコリンは降圧物質として公知であるが、該A-2ピークの一部として含有されるもので、本発明の降圧成分の血圧降下活性に占めるその効果の割合は小さいものと考えられる。

かくして、実施例1で得られた降圧成分の血圧降下作用をつぎのとおり検定した。

該メタノール抽出物211.8gを水200mlおよび酢酸エチル500mlに溶解し、攪拌し、放置した後、水層と酢酸エチル層に分離させた。該水層を酢酸エチル500mlで4回、続いてn-ブタノール500mlで5回抽出して不純物を除去した。次いで該水層を減圧下で濃縮して水抽出物137.1gを得た。

該水抽出物137.1gを28%酢酸水溶液250mlに溶解し、室温においてpH3.1の0.2Mビリジーン-酢酸緩衝液で平衡化したダウエクセス50W-X8カラム(内径4.7cm×高さ28.5cm、500ml、50~100メッシュ、ビリジーン型)に吸着させ、pH3.1の0.2Mビリジーン-酢酸緩衝液2.5lで未吸着物を溶出して洗浄した後、pH4.9の1.2Mビリジーン-酢酸緩衝液2.5lを用いて流速100ml/hrで溶出した。該当する溶出物を濃縮し、凍結乾燥して活性成分11.8gを得た。該活性成分11.8gを28%酢酸水溶液に溶解し、55℃においてpH3.1の0.2Mビリジーン-酢酸緩衝液で平衡化したアンバーライト

SHRをベントバルビタール麻酔し、右頸動脈を露出した。圧力計と接続した動脈カニューレを該動脈中に挿入した。次いで、生理食塩水に溶解したのちpHを7.0に調整した該紅麹降圧成分を静脈注射して血圧の変化を記録した。投与前の血圧を100%としたとき、0.1mg/kg体重での投与の場合は最大14%、1.0mg/kg体重での投与の場合は最大41%の血圧降下が認められた。

実施例2

水分率40%に調整した小麦を120℃で30分間蒸気滅菌した後、モナスカス・ビロウス(F04520)を接種し、好氣的に30℃で7日間静置培養した。これを通風乾燥機を用いて50℃で乾燥し、水分率12%の紅麹を得た。

該紅麹10kgを室温にて1週間、10倍量のメタノールに浸漬し、次いでメタノール層および残渣を分別した。該残渣は同様にしてさらに2回メタノール抽出を行った。全メタノール抽出液を減圧下、50℃で濃縮乾燥してメタノール抽出物211.8gを得た。

CG-120タイプⅢカラム(内径0.9cm×高さ156cm、100ml、400~600メッシュ)に吸着させ、pH3.1の0.2Mビリジーン-酢酸緩衝液200mlで洗浄した後、pH4.6の0.4Mビリジーン-酢酸緩衝液を用いて流速50ml/hrで溶出した。中性アミノ酸抽出成分に相当する溶出物を集めて濃縮し、凍結乾燥して前記の理化学的性質を有する本発明の成分44.3mgを得た。

かくして得られた本発明の成分を食品添加物としてパン生地原料に配合してパン生地を調製し(組成を第3表に示す)、これを180℃で35分かけて焼き上げてパンを製造した。また同時に本発明の成分の代わりに、小麦から調製した前記の紅麹を60℃で通気乾燥し、通常の方法で100メッシュより細かく粉末化した紅麹粉を、前記した本発明成分の配合量に相当する量だけ添加したパンを作製した。対照として本発明成分、紅麹粉を添加しないパンを同様にして製造して用いた。これらの3試験区に対し、外観、風味および血圧降下効果について比較した。

第 3 表

| 組成 | 区 | 西分添加区 | 紅糖添加区 | 対照区 |
|---------|---|-------|-------|-------|
| 強力小麦粉 | | 400g | 360g | 400g |
| 本発明西分 | | 1.4mg | — | — |
| 紅糖粉 | | — | 40g | — |
| 塩 | | 小さじ1杯 | 小さじ1杯 | 小さじ1杯 |
| ショートニング | | 40g | 40g | 40g |
| 砂糖 | | 20g | 20g | 20g |
| イースト | | 小さじ2杯 | 小さじ2杯 | 小さじ2杯 |
| 卵 | | 1個 | 1個 | 1個 |
| ぬるま湯 | | 60ml | 60ml | 60ml |
| 牛乳 | | 150ml | 150ml | 150ml |

外観については、紅糖粉添加区ではパン全体が赤褐色に着色したが、本発明西分添加区は対照区と比して大きな差異は認められなかった。

風味については、鋭敏な味覚を有する男女各10名に試食させてパネル試験を行った。その結果、20名全員が本発明西分添加区と対照区とは風味的に差異は認められないと判定した。一方、紅糖粉添加区では、焼成直後において20名全員が

風味的な差異は認められないと判定したが、一昼夜常温で放置したものについては、20名中12名(男5名、女7名)が、本発明西分添加区と対照区と比して、バサバサした舌ざわりを認め、若干風味的に劣ると判定した。

血圧降下作用については次のようにして判定した。前記した3区のパンを60℃で通気乾燥し、ミキサーを用いて粉末状とした。この粉末を用いて第4表に組成を示す試験飼料を調製した。

第 4 表

| 組成 | 区 | 対照区 | 西分添加 パン区 | 糖粉添加 パン区 | 対照パン区 |
|---------|---|-------|-------------|-------------|-------|
| カゼイン | | 22 | 22 | 22 | 22 |
| ラード | | 10 | 10 | 10 | 10 |
| ミネラルmix | | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| ビタミンmix | | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| 食塩 | | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 塩化コリン | | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| セルロース | | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| ショ糖 | | 59.15 | 53.15 | 53.15 | 53.15 |
| 西分添加パン | | — | 6.0 | — | — |
| 糖粉添加パン | | — | — | 6.0 | — |
| 対照パン | | — | — | — | 6.0 |

(%)

この飼料を蒸留水と共に1群が6匹の10週令SHRよりなる4群に15日間、自由摂取させた。その間、5日毎にラット尾動脈圧測定装置PS-100を用いて尾動脈圧を測定した。得られた結果を第5表に示す。

第 5 表

| 区 | 経日数 | 開始時 | 5日 | 10日 | 15日 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 対照区 | | 185 | 189 | 193 | 196 |
| 本発明西分添加 パン区 | | 185 | 179 | 180 | 182 |
| 紅糖粉添加 パン区 | | 185 | 180 | 182 | 183 |
| 対照パン区 | | 185 | 189 | 194 | 197 |

(mmHg)

第5表から明らかな如く、本発明西分添加パン区と紅糖粉添加パン区ではほぼ同程度の血圧上昇抑制効果が見られた。

紅糖粉添加パン区においても紅糖量は飼料全体に対して0.3%と少量であって日常無理なく摂取できる量であるが、紅糖を本発明の降圧西分に置き換えることによって添加量をさらに極微量とし、なおかつ同程度の血圧降下効果が達成される。また紅糖添加パンは外観および風味の点で一般のパンより若干劣るが、本発明の降圧西分を使用したパンではかかる問題は全くなく、このように必要添加量が極微量であるためにパンのみならずそ

他の食品に対してもそれらの諸性質を変えることなく使用できる。

実施例3

グルコース3.0%、グリセロール7.0%、ペプトン0.8%、大豆粉3.0%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%および $NaNO_3$ 0.2%を含有するpH7.0の液体培地にモナスカス・アンカIFO6540を接種し、30℃で10日間好氣的に培養した。遠心分離により菌体を除去した後、得られた培養液2ℓに酢酸エチル500mlを加え、攪拌し、放置した後、水層と酢酸エチル層を分離した。該水層を酢酸エチル500mlで4回、続いてn-ブタノール500mlで5回抽出して不純物を除去した。該水層を減圧下で濃縮して固形物101.7gを得た。該固形物101.7gを実施例1および2と同様にダウエックス50W-X8を用いるイオン交換クロマトグラフィー、続いてアンバーライトCG-120を用いるイオン交換クロマトグラフィーに付して精製し、本発明成分328mgを得た。

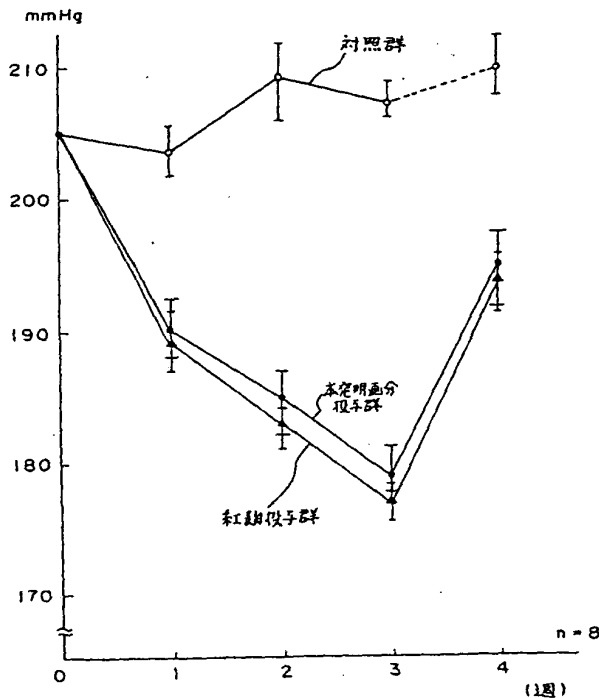
この降圧成分を生理食塩水に溶解し、1N水酸化ナトリウム水溶液でpH7.0に調整した後、経口ゾンテを用いて、12時間絶食させた13週令のSHR8頭に5mg/kg体重で投与した。対照として、同様にSHR8頭に生理食塩水のみを投与した。3時間後、ラット尾動脈圧測定装置P-100で血圧を測定した結果、対照群では血圧が平均173mmHgであったのに対し、紅麹エキス投与群では平均154mmHgであり投与時と比して11%と顕著な低下が見られた。

4. 図面の簡単な説明

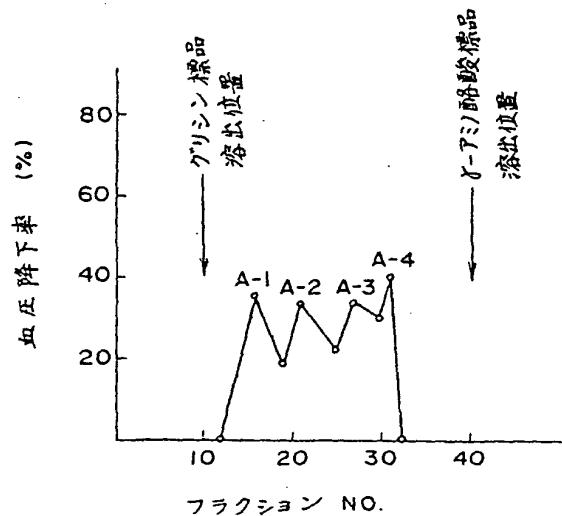
第1図は本発明の降圧成分をSHRラットに投与したときの血圧変化を表わすグラフ、第2図は本発明の降圧成分のアンバーライトCG-120カラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンを示すグラフ、第3図は第2図にA-2ピーク中のアセチルコリン同定結果を示す高速液体クロマトグラムである。

特許出願人 グンゼ株式会社
代理人 弁理士 青山 源 ほか2名

第1図



第2図



特開昭62-298598(9)

手続補正書(自発)

昭和61年8月8日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

昭和61年特許願第 141082 号

2. 発明の名称

モナスカス菌系状菌培養物の新規降圧成分

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 京都府綾部市青野町隠所1番地

名称 (133) グンゼ株式会社

4. 代理人

住所 大阪府大阪市東区本町2-10 本町ビル内

氏名 井理士(6214) 青山 篠 ほか2名



5. 補正命令の日付 自発

6. 補正の対象

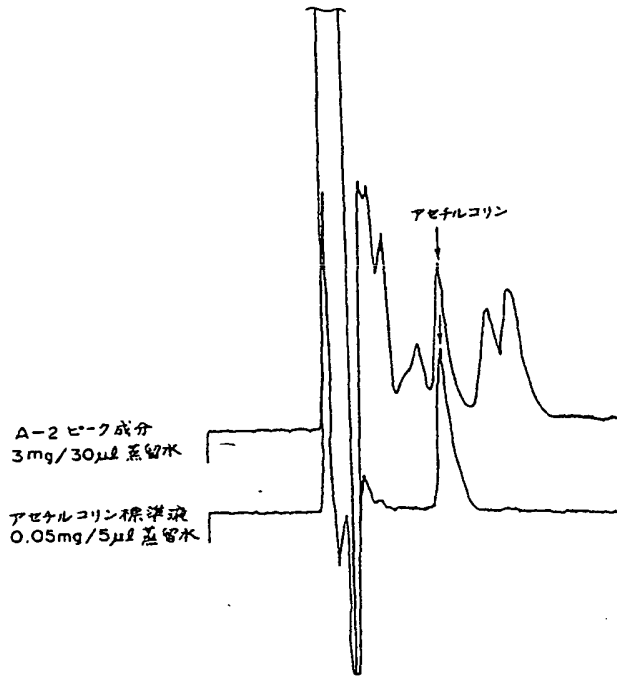
明細書の「発明の詳細な説明」の欄



方式
審査



第3図



7. 補正の内容

(1)明細書第9頁下から5行、「無毒性または」とあるを削除する。

(2)同書第10頁3行、「5.000mg」とあるを「5000mg」と補正する。

(3)同書第16頁12～13行、「水10ml」とあるを「水1ml」と補正する。

(4)同書第18頁2行、「3～5ml」とあるを「5ml」と補正する。

以上

